一体型ATP測定試薬キットと小型ルミノメーターを用いた農耕地土壌の微生物バイオマスの推定

誌名	日本土壌肥料學雑誌 = Journal of the science of soil and manure, Japan
ISSN	00290610
著者	青山, 正和
巻/号	82巻4号
掲載ページ	p. 305-308
発行年月	2011年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波事務所
Tsukuba Office, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

AgriKnowledge

ノ　ー　ト

一体型ATP測定試薬キットと小型ルミノメーターを用いた農耕地土壌の微生物バイオマスの推定*

青山正和

キーワード　ATP，微生物バイオマス，ルミノメーター，畑土壌，水田土壌

1．はじめに

近年，土壌診断のための土壌分析は，農業生産現場に近い施設でも行われており，土壌改良に役立っている．しかし，土壌診断の項目は化学性に関するものが主であり，土壌生物性の診断はほとんど行われていない．土壌生物性を評価する場合，最初に必要となる情報は土壌微生物量である．土壌微生物量は，一般に微生物バイオマスとして評価され，主にクロロホルムくん蒸法，基質誘導呼吸法やアデノシン5'－三リン酸（ATP）法が用いられている．しかしながら，これらの微生物バイオマス測定法は研究のために開発されたものであり，農協や普及センター等の農業生産現場に近い施設で行うことは困難である．前報（青山，2005）において，著者は食品関連施設等における清浄度検査の目的で比較的安価で市販されているATP測定用の一体型試薬キットと専用の小型ルミノメーターを用いて黒ボク土のATP測定を行い，ATP測定値とクロロホルムくん蒸－抽出法による微生物バイオマス炭素量との関係を調べたところ，両者の間には高い正の相関関係が存在することを報告した．ただし，この結果は黒ボク土，しかも地域的にはかなり限定された土壌について得られたものであり，水田土壌を対象としていなかった．したがって，ATP測定用の一体型試薬キットと小型ルミノメーターを用いた農耕地土壌の微生物バイオマス推定法を確立するためには，多くの土壌についてATP量と微生物バイオマス炭素量との関係を検討し，ATP量から微生物バイオマス炭素量への換算係数を求める必要がある．

そこで本研究では，ATP量から微生物バイオマス炭素量へ換算するための係数を決定することを目的として，土壌タイプならびに土地利用（水田，畑，果樹園）の異なる114点の農耕地土壌を採取し，クロロホルムくん蒸－抽出法で土壌微生物バイオマス炭素量を測定するとともに一体型試薬キットと小型ルミノメーターを用いて土壌のATPを測定し，両者の関係を検討した．

2．材料と方法

1）土壌試料

青森県内の農耕地から114点の土壌試料を採取し，実験に供した．内訳は，非黒ボク土畑土壌47点（水田転換畑土壌5点およびリンゴ園土壌3点を含む），非黒ボク土水田土壌24点，黒ボク土畑土壌35点および黒ボク土水田土壌8点である．非黒ボク土は主にグライ土，灰色低地土，褐色低地土に分類される沖積土壌であり，畑土壌の一部は褐色森林土を含んでいる．また，黒ボク土は岩木山起源の黒ボク土ならびに十和田・八甲田起源の黒ボク土からなる．畑土壌は2007年と2008年の7月から11月までの期間に表層10cmを採取し，水田土壌は2008年と2009年の10月から11月までの期間に落水後の作土層から採取した．採取した土壌は，湿潤状態のまま2 mmのふるいを通して実験に用いた．土壌の一部は，ふるいを通した後に風乾し，化学分析に用いた．

2）化学分析

風乾土について，pH（H_2O）ならびに全炭素量と全窒素量を測定した．pH（H_2O）は常法通り1：2.5水懸濁液についてガラス電極法で測定し，全炭素量と全窒素量はNC－アナライザー（住友化学 Sumigraph NC－90A）で分析した．

3）前培養

各土壌の乾土60 g相当量の湿潤土を200 mLビーカーにとり，25℃で7日間前培養した後，クロロホルムくん蒸－抽出法による微生物バイオマス炭素の測定ならびにATPの測定に供した．前培養は各土壌について3反復で行い，反復ごとにバイオマス炭素とATPを1連で測定した．なお，前培養に際して，前報（青山，2005）では最大容水量の60％水分に調節したが，本研究では簡便化のため，土壌水分の調節は行わなかった．

4）微生物バイオマス炭素量の測定

前報（青山，2005）と同じく，Vance *et al.*（1987）のクロロホルムくん蒸－抽出法に基づいて行った．

5）ATPの抽出

土壌からのATP抽出には，広く使われているトリクロロ酢酸（TCA）－リン酸－パラコートの混液を用いる方法（Jenkinson and Oades, 1979）では毒性が強く取り扱いが難しいと考えたため，前報（青山，2005）と同じく，ジメチルスルフォキシド（DMSO）とリン酸三ナトリウムによる抽出法（Bai *et al.*, 1988）を用いた．前培養

Masakazu AOYAMA: Estimation of microbial biomass in arable soils using an all in one ATP assay kit and a handy luminometer

* 本研究の主要部分は，平成20年度科学技術振興機構重点地域研究開発推進プログラム・シーズ発掘試験「低コストで簡便迅速な土壌微生物診断法の開発」の一部として実施した．また，本研究の一部は2009年9月の日本土壌肥料学会京都大会で発表した．

弘前大学農学生命科学部（036-8561 弘前市文京町3）
Corresponding Author：青山正和

2011年2月19日受付・2011年5月24日受理
日本土壌肥料学雑誌 第82巻 第4号 p.305～308（2011）

した乾土1.00 g相当量の湿潤土を100 mLビーカーに秤取し，10 mLのDMSOを加えてスターラーで2分間撹拌した後，40 mLの0.01 Mリン酸三ナトリウム溶液を加えて2分間撹拌した．さらに超音波バス（アズワンUS-1，出力55W）中で2分間超音波処理を行った後，あらかじめ0.005 M Mg-EDTAを含む0.01 Mグリシン溶液（pH 7.5）10 mLを入れた試験管に懸濁液1 mLをただちに加えて十分に混合し，希釈懸濁液を調製した．以下のATP測定にはこの希釈懸濁液を用いた．

6）ATPの測定

上記の希釈懸濁液について，前報（青山，2005）と同じく，拭き取り試験用の一体型試薬キットであるキッコーマン社製ルシパックワイドと専用の小型ルミノメーター（東亜DKK AF-20）を用いてATPを測定した．測定に際して，ルシパックワイド本体から綿棒ホルダーを引き抜いた後，抽出試薬の上の隔膜上に希釈懸濁液100 μLを注入した．つぎに，綿棒ホルダーを本体に戻して強く押し込み，2枚の隔膜を破って測定チューブまで挿入した．その直後に，本体を数回強く降りおろし，測定チューブ内で土壌懸濁液，抽出液および発光試薬を十分に混合した後，小型ルミノメーターに装着し，スタートボタンを押して相対発光量（Relative Light Unit；RLU）を測定した．RLUは，同一試料について連続して5～10回測定し，最大値を記録した．それとは別に，上述の希釈懸濁液1 mLに対してATP標準溶液（100 pg μL^{-1}）100 μLを加えた液を調製し，この110 μLに対して上記と同様にRLUを測定した．さらに，ブランクとして抽出試薬のみのRLUの測定を行った．ATP量は，下記の式により算出した．

$$C = (N-B)/(M-N) \times 10^{-3}$$

Cは希釈抽出液100 μL中のATP量（μg），Bはブランクの RLU，NはATP標準液無添加の場合のRLU, MはATP標準液を添加した場合のRLUである．なお，Bai *et al.*（1988）とMartens（2001）の研究においてATPの回収率はほぼ100 %であったとされていることから，乾土あたりのATP量の算出にあたっては，回収率を考慮しなかった．

3．結果と考察

供試土壌のpH（H_2O）は3.9～7.1の範囲にあり，土壌有機物含量の指標となる全炭素量も4.2～88.8g kg^{-1}の範囲にあった．非黒ボク土の畑地と水田ならびに黒ボク土の畑地と水田に分けて頻度分布をみた場合にも，それぞれ広い範囲をカバーしていた（表1）．なお，pH（H_2O）の土壌別の平均値±標準偏差は，非黒ボク土・畑地で5.54 ± 0.78，非黒ボク土・水田で5.17 ± 0.27，黒ボク土・畑地で5.69 ± 0.51，黒ボク土・水田で5.58 ± 0.29であり，全炭素量のそれは，非黒ボク土・畑地で25.6 ± 11.9g kg^{-1}，非黒ボク土・水田で29.7 ± 6.1g kg^{-1}，黒ボク土・畑地で49.6 ± 18.6g kg^{-1}，黒ボク土・水田で60.8 ± 17.4g kg^{-1}であった．

これらの土壌について，一体型試薬キットと小型ルミノメーターを用いてATP量を測定し，クロロホルムくん蒸法で測定した微生物バイオマス炭素量との関係を検討したところ，両者の間には正の相関関係が認められた．ただし，畑土壌と水田土壌とでは傾向が大きく異なっており，水田転換畑土壌は水田土壌と同じ傾向にあった．水田転換畑土壌を除いた畑土壌についてATP量（X）と微生物バイオマス炭素量（Y）との関係を原点を通る一次回帰式に当てはめると（図1A），Y=117Xという関係式が得られた（r=0.86***）．なお，この中にはリンゴ園土壌も含まれている．これに対して，水田土壌と水田転換畑土壌の場合には（図1B），非黒ボク土，黒ボク土を問わず，Y=202Xという関係式が得られた（r=0.67***）．

これらの関係式における傾きは，微生物バイオマス炭素量とATPの比（バイオマス炭素/ATP比）に相当するが，この数値に土壌の化学性が影響しているかどうかを検討するため，pHと全炭素量によって土壌を細区分して個々の土壌のバイオマス炭素／ATP比を計算し，それらの平均値に有意差があるかどうかを検定した（表2）．水田および水田転換畑の黒ボク土については，細区分しなかった．畑土壌と水田土壌および水田転換畑土壌との間には，統計的に有意な差が検出されたが，pHと全炭素量は有意な影響を及ぼしていないことが認められた．なお，バイオマス炭素／ATP比を個別に計算した場合には，回帰式から得られたバイオマス炭素／ATP比よりやや高い値が得られ

表1　供試土壌pH（H_2O）と全炭素量の頻度分布

土壌	pH（H_2O）							
	<4.0	4.0-4.5	4.5-5.0	5.0-5.5	5.5-6.0	6.0-6.5	6.5-7.0	>7.0
非黒ボク土・畑地	1	2	10	10	8	11	4	1
黒ボク土・畑地	0	1	2	7	15	9	1	0
非黒ボク土・水田	0	0	5	17	2	0	0	0
黒ボク土・水田	0	0	0	5	2	1	0	0
土壌	全炭素量（g kg^{-1}）							
	<20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90
非黒ボク土・畑地	15	20	7	2	3	0	0	0
黒ボク土・畑地	1	4	6	9	4	4	6	1
非黒ボク土・水田	1	11	11	1	0	0	0	0
黒ボク土・水田	0	0	0	3	2	0	1	2

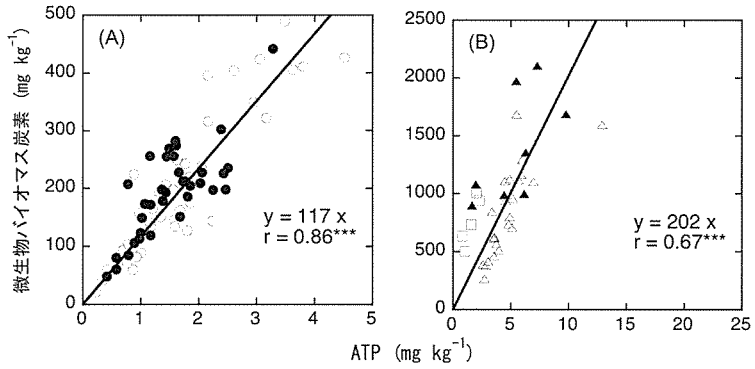

図1　水田転換畑土壌を除いた畑土壌（A）ならびに水田土壌と水田転換畑土壌（B）における ATP 量と微生物バイオマス量の関係
○非黒ボク土畑土壌；●黒ボク土畑土壌；△非黒ボク土水田土壌；□非黒ボク土水田転換畑土壌；▲黒ボク土水田．***0.1% 水準で有意

表2　土地利用，土壌タイプ，pH と全炭素量とバイオマス炭素／ATP 比

水田転換畑を除いた畑地						水田および水田転換畑		
非黒ボク土			黒ボク土			非黒ボク土		黒ボク土
pH (H_2O)								
< 5.0	5.0–6.0	> 6.0	< 5.0	5.0–6.0	> 6.0	< 5.0	> 5.0	> 5.0
112±10 a	117±11 a	120±8 a	112±14 a	124±8 a	140±11 a	256±20 b	239±15 b	224±28 b
(10)	(17)	(15)	(3)	(22)	(10)	(8)	(21)	(8)
全炭素量 (g kg^{-1})								
< 20	20–30	> 30	< 40	40–60	> 60	< 30	> 30	> 40
103±8 a	123±10 a	128±8 a	123±13 a	131±10 a	128±10 a	234±17 b	254±16 b	224±28 b
(15)	(17)	(10)	(11)	(13)	(11)	(15)	(14)	(8)

平均値±標準誤差．表中のアルファベットは Tukey 法による多重比較検定の結果を示し，同記号は 5 %水準で有意差がないことを示す．カッコ内の数字は試料数．

たが，ATP 量から微生物バイオマス炭素量を推定するには，回帰式から得られた値を換算係数として用いる方が汎用性は高いと考えられる．したがって，畑土壌では ATP 測定値を 117 倍，水田土壌と水田転換畑土壌では 202 倍することにより微生物バイオマス炭素量に換算できる．

前報（青山, 2005）において，7 点の黒ボク土畑土壌および未耕地土壌について本研究と同じ一体型試薬キットと小型ルミノメーターで測定した ATP 量とクロロホルムくん蒸法で測定した微生物バイオマス炭素量との関係は，Y=128X で表されることを報告した．この関係は，本研究で畑土壌について得られた Y=117X という関係に近いものであった．前報（青山, 2005）では前培養時に土壌水分を最大容水量の 60 %に調節したのに対して，本研究では前培養時に水分調節を行わなかった．それにも関わらず，ATP 量と微生物バイオマス炭素量との関係は大きくは変わらなかったことから，前培養時の土壌水分の調節は必須ではないと考えられた．

土壌の微生物バイオマス炭素量と ATP 量との間の関係については，多くの検討が行われてきている．Contin *et al.*（2001）は，それまで得られていた多数のデータを取りまとめて，土壌の微生物バイオマス炭素量と ATP 量との間には，ATP（μmol g^{-1} 乾土）= 0.014 ×微生物バイオマス炭素（μg g^{-1} 乾土）の関係が成り立つことを報告している．これを mg kg^{-1} 乾土で表した微生物バイオマス炭素量（Y）と ATP 量（X）で示すと，Y=190X となる．ただし，彼らが用いた ATP 測定値の多くは，トリクロロ酢酸（TCA），リン酸およびパラコートを用いた抽出によって得られたものである．一方，Martens（2001）は，本研究で採用したと同じ DMSO－リン酸三ナトリウムにより土壌から ATP を抽出しているが，バイオマス炭素／ATP 比は 208～217 であると報告している．これらの報告と比べると，本研究の畑土壌について得られた 117 という数値はかなり低い．

一体型試薬キットであるルシパックワイドを用いた ATP 測定は，ルシフェリン－ルシフェラーゼ反応による発光に基づいているが，さらにアデノシン 5’－一リン酸（AMP）を ATP に変換する酵素であるピルベート・オルソフォスフェート・ジキナーゼを加えることによって，ルシフェリン－ルシフェラーゼ反応で生じた AMP を再び ATP に変換して発光強度を高めている（キッコーマン, 2001）．このため，本法で求めた ATP 測定値は AMP も含めた値となり，実際より高く見積もられている可能性がある．このことが，これまで行われてきた研究と比べてバイオマス炭素／ATP 比が低い原因であると推定される．

水田土壌と水田転換畑土壌に関しては，バイオマス炭素／ATP 比は 202 と，畑土壌と比べてかなり高い値を示し

た. Inubushi *et al.* (1991) は, 土壌を湛水条件下と好気条件下で培養してATP量と微生物バイオマスの変化を追跡し, 湛水条件下ではいずれの値も減少するが, 微生物バイオマスよりATP量の減少が著しいことを報告している. このことは, 湛水条件下ではバイオマス炭素／ATP比が上昇することを意味している. 本研究で使用した水田土壌, 水田転換畑土壌のいずれも採取時には湛水状態ではなかったが, 湛水条件を経ることもしくは水分過多の状態が土壌の微生物バイオマスとATPの関係に影響を及ぼしている可能性が示唆される. Shibahara and Inubushi (1995) は, 湛水前の水田土壌についてTCA－リン酸で抽出したATP量を測定し, クロロホルムくん蒸－抽出法で測定した微生物バイオマス炭素量との関係を検討している. 彼らの結果からバイオマス炭素／ATP比を求めると, 232となり, Contin *et al.* (2001) が畑土壌に関して得た190より大きな値となった. このように, 水田土壌では畑土壌と比べてバイオマス炭素／ATP比が高くなることが認められており, 本研究での結果と一致している.

以上のように, DMSO－リン酸三ナトリウム抽出後に清浄度検査用の一体型ATP測定試薬キットと小型ルミノメーターを使うことによって, 土壌微生物バイオマス炭素量が推定可能であることが示された. ただし, 畑土壌と水田転換畑土壌を含めた水田土壌とではATP測定値から微生物バイオマス炭素量への換算係数は異なり, 前者ではATP測定値を117倍, 後者では202倍することによって微生物バイオマス炭素量に換算できることが判明した. 本法は, 清浄度検査用の一体型試薬キットと小型ルミノメーターを用いているので, 測定操作自体は簡易に行うことができるが, 抽出にはスターラーと超音波バスを用いているため, 現場に近い施設で土壌生物性の診断に用いるには, 前培養を含めた前処理および抽出法のさらなる検討が必要であると考える.

謝　辞：本研究を行うにあたり, 実験を担当された西塚由季子さん, 林　沙樹さんならびに山田智珠さんに感謝いたします.

文　献

青山正和　2005. 小型ルミノメーターを用いたATP測定による黒ボク土の微生物バイオマスの推定. 土と微生物, **59**, 41–44.

Bai, Q. Y., Zelles, L., Scheunert, I., and Korte, F. 1988. A simple effective procedure for the determination of adenosine triphosphate in soils. *Chemosphere*, **17**, 2461–2470.

Contin, M., Todd, A., and Brookes, P. C. 2001. The ATP concentration in the soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 701–704.

Inubushi, K., Brookes, P. C., and Jenkinson, D. S. 1991. Soil microbial bimass C, N and ninhydrin-N in aerobic and anaerobic soils measured by the fumigation-extaction. *Soil Biol. Biochem.*, **23**, 737–741.

Jenkinson, D. S., and Oades, J. M. 1979. A method for measuring adenosine triphosphate in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **11**, 193–199.

キッコーマン 2001.「ルシパック ワイド」取扱説明書, p.1–4, キッコーマン (株), 東京.

Martens, R. 2001. Estimation of ATP in soil: extraction methods and calculation of extraction efficiency. *Soil Biol. Biochem.*, **33**, 973–982.

Shibahara, F., and Inubushi, K. 1995. Measurements of microbial biomass C and N in paddy soils by the fumigation-extraction method. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **41**, 681–689.

Vance, E. D., Brookes, P. C., and Jenkinson, D. S. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, **19**, 703–707.